



TITLE:

# 曲率誘導ペプチドによる脂質膜の 構造認識と変化誘導に関する研究( Abstract\_要旨)

AUTHOR(S):

村山, 知

---

CITATION:

村山, 知. 曲率誘導ペプチドによる脂質膜の構造認識と変化誘導に関する研究. 京都大学, 2017, 博士(薬科学)

ISSUE DATE:

2017-03-23

URL:

<https://doi.org/10.14989/doctor.k20307>

RIGHT:

許諾条件により本文は2018-03-22に公開; 許諾条件により要旨は2017-06-22に公開

京都大学	博 士（薬科学）	氏 名	村山 知
論文題目	曲率誘導ペプチドによる脂質膜の構造認識と変化誘導に関する研究		
<p>（論文内容の要旨）</p> <p>膜と相互作用するタンパク質やペプチドにおいて、数多くの両親媒性ヘリックス構造がその活性発現に重要な役割を果たしている。両親媒性ペプチドの中には、脂質膜の曲がり具合（曲率）を認識するものや曲率変化を誘導するものも知られ、こうしたペプチドで生体膜の構造変化を誘起できれば、生体膜を標的とする新しい分子ツールへの応用も期待できる。しかし、曲率誘導ペプチドと脂質膜との相互作用様式については未知の点が多く、配列デザインによってこれを制御することは難しい。本研究では、曲率誘導能を有する両親媒性ペプチドの膜相互作用に関して情報を得ることを目的に、膜傷害における疎水面の配列効果（第一章）について検討を加えた。また、代表的な細胞膜透過性ペプチドであるオクタアルギニン（R8）の膜透過における曲率誘導ペプチドの促進効果（第二章）について検討を行った。</p>			
<p><b>第一章 アデノウイルス由来曲率誘導ペプチドの膜相互作用における配列効果</b></p> <p>二次構造や膜との相互作用への各アミノ酸残基の寄与の理解は理論的な分子の設計に欠かせないが、親水性残基に関する知見に比べて疎水性残基の寄与についての情報は限られている。そこで、アデノウイルス由来の膜傷害性ドメインをモデルとして用い、疎水性残基に着目して膜相互作用と傷害能における配列効果の検討を行った。</p> <p>アデノウイルスの主要なカプシドタンパク質の一つであるAdenovirus internal protein VI（AdVpVI）は、正の曲率誘導を介したpH非依存的な膜傷害能を有し、両親媒性のヘリックス構造をとるN末端領域がAdVpVIの膜相互作用・膜傷害性に不可欠であることが報告されている。まず、AdVpVI33－55位に相当するペプチド(WT)に加え、膜傷害に対しての重要性が示されている40位のロイシン残基をフェニルアラニン（L40F）などの疎水性アミノ酸に置換した変異体ペプチドをFmoc固相合成法によって合成した。各変異体が膜と相互作用したときの二次構造と膜傷害性について、人工脂質膜（リポソーム）存在下の円偏光二色性スペクトルと色素溶出活性測定によって評価した結果、各変異体が膜と相互作用した際の二次構造はわずかに異なるものの、膜傷害性はWTと同程度だった。また、WTとL40Fについて、示差走査型熱量測定（DSC）によって曲率誘導性を評価したところ、どちらも正の曲率誘導能を有することが示唆された。さらに、直径の異なるリポソームへの親和性を比較すると、どちらも直径の小さい（曲率の高い）リポソームに対してより高い親和性を示した。しかし、WTの膜傷害性はリポソームの直径によって影響を受けなかったのに対し、L40Fの膜傷害性は直径の減少（曲率の増加）に伴い、有意に低下した。DSCを用いた検討から、WTに比べL40Fの膜脂質のアシル鎖領域との相互作用が弱いことが示唆され、フェニルアラニン置換による膜のアシル鎖領域との相互作用の低下が、曲率に依存した膜傷害性に影響する可能性が示された。</p>			

## 第二章 両親媒性ペプチドによる細胞膜の構造変化誘導に伴うアルギニンペプチドの膜透過促進

HIV-1 TatペプチドやR8などのアルギニンに富む膜透過性ペプチド（アルギニンペプチド）を用いて細胞内に種々の薬物や生理活性タンパク質を導入できることが知られている。アルギニンペプチドの細胞内移行経路としては、エンドサイトーシスを介する経路と細胞膜（形質膜）の直接透過によって細胞内に至る経路があることが示されており、後者の経路を促進する要因として、ペプチドの細胞膜上への集積度や膜電位などが指摘されてきた。当研究室では以前、正曲率誘導能をもつクラスリン被覆小窩の付随タンパク質epsin-1のN末端ペプチド（EpN18）存在下でオクタアルギニン（R8）の膜透過が促進されることを報告している（Pujalsら、ACS Chem. Biol. 2013）。ここでは、他の曲率誘導ペプチドがEpN18と同様にR8の膜透過促進効果を有するかを検討するとともに、膜透過促進機序についても検討を加えた。

リポソーム膜に形態変化を誘起することが報告されている、細胞内小胞形成関連タンパク質のN末端両親媒性ヘリックス領域に相当するペプチド7種類を、Fmoc固相合成法によって合成した。EpN18を含むこれらのペプチドの曲率誘導性をDSCによって評価した結果、それぞれ正または負の曲率誘導能を有することが示唆された。各ペプチド存在下でのR8の細胞内取込を比較したところ、EpN18と同じく正曲率誘導能をもつSar1pのN末端23残基ペプチド（Sar1p\_23）存在下で顕著なR8の膜透過促進効果が認められた。環境応答型プローブDi-4-ANEPPDHQを用いてR8および両親媒性ペプチドの膜相互作用の細胞膜構造への影響を評価したところ、EpN18とSar1p\_23は形質膜のパッキングを緩める作用を有することが示唆された。R8の添加によって膜のパッキングはさらに緩められることが分かり、EpN18やSar1p\_23の膜相互作用が誘起する、パッキング密度の低下に伴う形質膜の構造欠陥が、R8の膜透過促進効果をもたらす可能性が示唆された。

本研究における曲率誘導能を有する両親媒性ペプチドと膜との相互作用様式に関する知見は、種々の膜-タンパク質相互作用様式の解明や、生体膜を標的とする分子ツールの開発に寄与するものと考えられる。

(論文審査の結果の要旨)

申請者は、生体膜の構造変化を介して細胞機能を制御する新規分子ツールとしての応用を目指し、膜の曲がり具合「曲率」の変化を誘導する両親媒性ペプチドの膜相互作用の詳細について、モデル膜および細胞を用いて複数の角度から検討した。

第一章では、アデノウイルス由来の膜傷害性タンパク質の N 末端領域 (AdVpVI 33-55) をモデル配列として、現状で特に知見が限られている疎水面の配列効果に焦点を当てて検討を行った。膜相互作用に重要であることが既知である 40 位のロイシンに着目し、芳香族アミノ酸であるフェニルアラニンへ置換したペプチド (L40F) と、野生型 (WT) との膜相互作用を比較した。人工脂質膜 (リポソーム) を用いた示差走査型熱量測定から、ともに正の曲率誘導能を有する一方、L40F の方が WT よりも脂質膜のアシル鎖領域へもたらす影響が小さいことが示唆されたことより、両親媒性ペプチドの疎水面を構成するアミノ酸によってペプチドの膜との結合状態が変わる可能性を指摘した。また、曲率の異なるリポソームに対する親和性は両ペプチドの間で大きな差が見られないのに対し、曲率の大きいリポソームに対する L40F の膜傷害性は WT に比べて低いことを見出し、親和性以外の要因が曲率依存的な膜傷害性に影響を及ぼしうることを示した。

第二章では、細胞内への生理活性物質の導入法として用いられるアルギニンに富む膜透過性ペプチド (アルギニンペプチド) の直接膜透過促進機序について知見を加えた。膜の形態変化をもたらすタンパク質の N 末端領域を由来とする両親媒性ペプチド 7 種類のうち、既報告の EpN18 に加えて複数のペプチドがオクタアルギニン (R8) の膜透過促進効果を示し、Sar1p\_23 が最も著しい効果を有することが示された。この R8 膜透過促進効果と、リポソームを用いた示差走査型熱量測定の結果示唆された曲率誘導性との間には強い相関が認められなかった。環境応答型蛍光プローブ (Di-4-ANEPPDHQ) を用い、GP (Generalized Polarization) 値を指標とした細胞膜の構造変化の評価より、脂質パッキング密度の低下が R8 の膜透過促進に寄与しうることを指摘した。さらに、R8 が直接膜透過する条件で GP 値のより低い領域が R8 の流入点となること、R8 膜透過促進効果をもつ低分子化合物であるピレンブチレート (PyB) も EpN18 や Sar1p\_23 と同様に細胞膜の GP 値を低下させることを見出し、これらは脂質パッキング密度の低下が R8 の膜透過促進要因である可能性を強く支持する結果である。

以上、本論文は、曲率誘導能を有する両親媒性ペプチドに関して、膜傷害性や膜結合様式における疎水面の配列効果や、R8 の膜透過促進機序における細胞膜のパッキング状態の寄与の重要性を新たに指摘するものであり、生体膜の構造変化を制御する分子ツールの開発においても、細胞生物学的にも有用な知見を与えるものと考えられる。

よって、本論文は博士 (薬科学) の学位論文として価値あるものと認める。

さらに、平成 29 年 2 月 24 日、論文内容とそれに関連した事項について口頭試問を行った結果、合格と認めた。